

⑫ 公表特許公報(A)

昭60-502103

⑬ 公表 昭和60年(1985)12月5日

⑭ Int. Cl.⁴A 61 K 35/14
35/12
35/39

識別記号

庁内整理番号

7138-4C
7138-4C
7138-4C

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全 13 頁)

⑯ 発明の名称 移植器官及び組織の受容性を高める方法

⑰ 特 願 昭59-503313

⑱ 出 願 昭59(1984)8月22日

⑲ 翻訳文提出日 昭60(1985)5月1日

⑳ 国際出願 PCT/US84/01347

㉑ 国際公開番号 WO85/00954

㉒ 国際公開日 昭60(1985)3月14日

優先権主張 ㉓ 1983年9月1日 ㉔ 米国(US) ㉕ 528525

㉖ 発 明 者 リームツマ, キース

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10024、ニュー・ヨーク、セン
トラル・パーク・ウエスト・211㉗ 出 願 人 ザ・トラステイズ・オブ・コ
ロンビア・ユニヴァーシティ・
イン・ザ・シティ・オブ・ニュ
ー・ヨークアメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10027、ニュー・ヨーク、ウエ
スト・ワンハンドレッド・アンド・シックスティーン・ストリー
ト・アンド・ブロードウェイ(番地なし)

㉘ 代 理 人 弁理士 川口 義雄

㉙ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB
(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 主体における移植器官又は移植組織の受容性を高める方法であって、提供体固有の血液を適当量の紫外線で適当時間放射処理し、該器官又は該組織を主体に移植する前に適当期間主体に、照射された血液を輸血し、次いで該器官又は該組織を主体に移植することからなる前記方法。
2. 主体が人間である請求の範囲1の方法。
3. 器官又は組織が、腎臓、心臓、肺、肝臓、腸もしくは骨髄又はこれらに由来するものである請求の範囲1の方法。
4. 適当量が約1000 J/m² よりも少ない請求の範囲1の方法。
5. 適当時間が約10分よりも大である請求の範囲1の方法。
6. 主体に照射後の血液を輸血する適当期間が移植より約1週間前であり、かつ1回より多くの輸血を含む請求の範囲1の方法。
7. 主体に照射後の血液を輸血する適当期間が移植前3週間、2週間及び1週間の輸血を含む請求の範囲6の方法。
8. 適当量の紫外線放射で照射された提供体固有の血液。
9. 適当量が約1000 J/m² よりも少ない請求の範囲8の

提供体固有の血液。

10. 請求の範囲1の方法により処理された主体。
11. 主体における移植器官又は移植組織の受容性を高める方法であって、移植される器官又は組織を適当時間適当量の紫外線放射で処理し、次いで主体に照射された該器官又は該組織を移植することからなる前記方法。
12. 主体が人間である請求の範囲11に記載の方法。
13. 移植される器官又は組織が腎臓、心臓、肺、肝臓、腸もしくは骨髄又はこれらに由来するものである請求の範囲11の方法。
14. 器官又は組織が脾臓細胞である請求の範囲13の方法。
15. 適当量が約1000 J/m² よりも少ない請求の範囲11の方法。
16. 適当時間が約10分よりも大である請求の範囲11の方法。
17. 適当量の紫外線放射で照射された器官又は組織。
18. 適当量の紫外線放射で照射された脾臓細胞。
19. 適当量が約1000 J/m² よりも少ない請求の範囲17の器官又は組織。
20. 器官又は組織を適当時間適当量の紫外線放射で処理するこ

とからなる、請求の範囲17の器官又は組織を調製する方法。

21. 請求の範囲11の方法により処理された主体。

移植器官及び組織の受容性を高める方法

本発明は、米国保健衛生省国立衛生研究所からの認可番号HL 14799及びAM 30468の下での一連の研究からなされたものである。

発明の要約

提供体固有の血液を適当量の紫外線放射で適当時間処理し、器官又は組織を移植する前の適当期間、主体に照射後の血液を輸血し、次いで主体に該器官又は該組織を移植することにより主体における移植器官又は組織の受容性を高めることができる。

主体に於ける移植器官又は組織の受容性は、また移植される該器官又は該組織を適当量の紫外線放射で適当時間処理し、次いで主体に該器官又は該組織を移植することにより、高めることができる。

適当に照射された提供体の血液、器官及び組織は、外科的移植に好ましく使用することができる。

図面の簡単な説明

第1図。島同種移植片のACI糖尿病受容体に於ける生存パーセントを示す図。グループI (○) はルイスUV照射血液お

よびルイス島同種移植片を輸注されたもの。グループII (△) は非処理ルイス血液およびルイス島同種移植片を輸注されたもの。グループIII (□) は輸血及びルイス島同種移植片を輸注されなかった対照注容体。グループIV (●) はグループIのように輸血されたものであるが第三者のW/F (RT₂^U) 島を移植されたもの。

第2図。ルイス樹枝状細胞(DC)のMLC刺激活性に対するUV照射量の影響。MLCは、応答細胞としてACI胸管リンパ球(TDL)を使用し且つ刺激細胞としてルイスラット求心性リンパ由来DCを使用して行なった。樹枝状細胞を単離するために用いた方法は学術雑誌(20)に記載されている。簡単にいえば、腹部リンパ節を胸管排液前6週間にラットから取り出した。リンパを36時間に亘って収集し、得られた細胞を高密度BSA遠心分離ステップ(44)によりDCリッチとした。得られた低密度細胞は、顕著な形態学的外観を示す(45) DC集団を約70%含んでいた。これらの細胞を、UV照射及びMLCに使用する前にガンマ照射(1600ラッド)した。DCを開口のベトリ皿中磁気棒で一定に攪拌しながらHBSSに懸濁させてUV照射した。UV照射源は、源から10cm離れ

たところで測定すると310nmで1mW/cm²のフラックスを示す2つのシルバニアFS20ランプ列(カナダ、UVプロダクトのUVX-ラジオメーター)であった。細胞を、96個のウェルを持つマイクロタイタープレート中で、100mg/mlのストレプトマイシンおよびペニシリン含有し且つ10%ラット血清を添加されたRPMI 1640中で3重に培養した。結果は16時間(H³)チミジンパルス期間を含む96時間培養後の(H³)=チミジン摂取量を示し、次の式で表わした。

$$\text{刺激指数(SI)} = \frac{\text{実験平均CPM}}{\text{対照平均CPM}}$$

第3図。同系移植後の島の機能に及ぼすUV照射量の影響。ルイスラットを静注ストレプトソトシン(60mg/kg(デュリン博士(Dr. Dulin)、アップジョン(Uppjohn)、カラマゾ(kalamazo)、ミシガン(Michigan)の好意による)で糖尿病にし、もし血液のグルコースが3週間の測定期間連続して300mg/dlであったなら受容体として使用した。コラゲナーゼ消化(46)、フィコール(Ficoll)勾配分離(47)及びそれに続いて立体顕微鏡下のハンドピッキングによってルイス島を分離した。分離した島をベトリディッシュのHBSS中に懸濁しマグネチックバーで一定速度で攪拌しながら照射した。DC照射に使用したの

と同じUV源であった。照射後、10%FCSのCMRL 1066中で24時間、37℃、5%CO₂下で培養し、門静脈経由で移植した。グループIの島は800J/m² (n=2)；グループIIの島は900J/m² (n=2)；グループIIIの島は1000J/m² (n=2)；グループIVの島は1100J/m² (n=3)の照射を受けた。斜線は通常の血液グルコースの範囲を表わす。

第4図。ルイスUV照射及び未照射島の糖尿ACI受容体に於ける生存。前述したように静注ストレプトゾトシンを用いてACIラットを糖尿病にさせた。ルイス島を同系移植の場合に記載したように分離し、前述したように正確に900J/m²でUV照射した。門脈内移植に先立ってUV照射及び未照射の島を24時間培養した。もし血液グルコースが引き続く2日間の測定で200mg/dlであったなら島は拒絶されたと考えた。

○……○ACIに対するUV未照射でのルイス島；

●……●ACIに対する事前UV照射したルイス島；

発明の詳細な説明

本願明細書全体を通じて様々な文献参照はアラビア数字を用いて行ない、クレームの直前に“参照及び注解”という表題で

望ましくは、照射後の血液を、器官又は組織を移植される主体に実際の移植操作前適当期間輸血する。好ましくは、器官又は組織の移植の少なくとも1週間前に少なくとも2回以上紫外線照射された提供体固有の血液を輸血する。現在では移植の3週間、2週間、1週間前にそれぞれ1回、計3回主体に輸血するのが好ましい。適当に照射された提供体固有の血液を主体に輸血した後、外科的な常套手段を使って器官又は組織を移植する。

紫外線照射された提供体固有の血液を輸血し、移植器官又は組織の受容性を高める方法に代るもう1つの方法は、紫外線照射した器官又は組織を用いる方法である。従って本発明は、移植される器官又は組織を適当量の紫外線で適当時間処理し、次いで主体に該照射器官又は該組織を移植することにより、主体における移植器官又は移植組織の受容性を高める方法をも提供するものである。この方法もまた広範囲の主体に適用され得るが、移植外科手術を必要としている人間の患者に用いることを考えており、例えば腎臓、心臓、肺、肝臓又は腸の移植又はこれらの器官由来の組織移植又は、例えばすい臓の島細胞(islet cells)又は骨髄のような他の器官由来の組織移植が考えられ

記載されている。これらの参考文献の全開示内容は本出願中に参照例として編入され、本発明がなされた時点の当該分野に於ける技術水準に関する情報を提供する。

本発明は、提供体固有の血液を適当量の紫外線放射で適当時間処理し、器官又は組織を移植する前の適当期間主体に照射後の血液を輸血し、次いで主体に該器官又は該組織を移植することにより主体における移植器官又は組織の受容性を高める方法を提供する。

本発明は広範囲な主体に適用され得るが、器官又は組織移植を必要としている人間の患者に用いることをまず第1に意図している。原理的には本発明方法はどんな器官又は組織にも使用され得る。例えば、腎臓、心臓、肺、肝臓及び腸などがこれに含まれる。組織はこれらの器官由来のもの又は例えば骨髄のような他の器官由来のものであり得る。

移植する器官又は組織を種々の放射量の紫外線で照射することができ。現在好ましいとされる量は約1000J/m²より少ない放射量である。それらの器官又は組織は種々の時間紫外線照射にさらされ得る。現在好ましいとされる紫外線放射時間は約10分より長い時間、例えば約20分間である。

る。

種々の紫外線放射量を様々な時間放射し得るが、現在好ましいとされる量は強度が約1000J/m²より小さいもので、少なくとも10分間、例えば20分間主体に放射する。その後、照射された器官又は組織を主体に移植し得る。移植外科手術に要する時間は、それ以前に照射された器官又は組織を保存しておく時間と同様にいろいろと変り得るが、何よりもまず該器官又は該組織の性質によってその限界時間が決まる。一般的には、照射された器官又は組織はその照射後2～3日以内に、例えば24時間以内に使用される。実際の移植は常套手段を用いて行なわれる。

実験の詳細な記載

A. UV-照射提供体固有血液

以下に示す、照射された提供体固有の血液を輸血することに関する実験は1983年8月19日付サイエンス、第221巻、第754頁～第756頁にも記載されている。

I領域関連抗原(Ia)担持細胞を抗Ia血清によって取り除かれたマウスに対する同種(allogeneic)の脾臓の島(islets)の移植の成功及びこの抗Ia血清によって皮膚の同種移植(all

ografts)の受容性が高まること(1)は、I a 担持細胞を欠いた同種組織は異物として認識されずに受容されるということを示唆するものである。これらの実験に於いて除去されたI a 担持細胞の型は知られていないが、しかし樹枝状細胞(dendritic cell)のように思われる。なぜならば、I a 担持樹枝状細胞は、ヒトの腎臓、心臓、甲状腺及び皮膚の実質(parenchyma)並びに島の凍結切片中に存在するからである(2)。このように広い分布は、同種移植器官からI a 担持細胞を除去することは脾臓の島移植にだけでなく他の器官の移植にも同様に臨床的応用が効き得るということを示唆している。主体による異物の同種移植の最初の認識を取り除くことは、更なる免疫抑制を必要とせず同種移植を成功させる上で決定的なものであるが、同種移植の機能を維持することは主体中で提供体固有のサブレッサーTリンパ球が開始するかどうかにかんして依存し得る(3)。このような同種組織に対する非応答(unresponsiveness)の状態は、I a ネガティブな血小板や赤血球細胞が初期免疫応答を惹起することが出来ずに、それに引き続いて起こるI a 担持細胞による誘発を弱める際に見られるものである(3)。

糖尿病にかかったマウスをI a 担持細胞を欠いた提供体の血

液で処理すると、血液提供株の新鮮で未処理な同種島の移植に成功したことで上記の考えは更に支持された(4)。従って、I a を持っていない提供体の血液細胞で免疫することにより特異的サブレッサー細胞が刺激されて受容体に於ける提供株に対する免疫非応答が誘発されると思われる。

我々が示した、成獣における提供体固有の免疫非応答を誘導し、それによって島の同種移植の長期生存を可能にする迅速且つ簡便な方法は、提供体固有の血液を輸血することで、1つのハプロタイプ(haplo type)を持つ不適正な提供体と受容体との組み合わせのうちの90%より多くの場合に、腎臓の同種移植したものが1年間生存したという最近の臨床研究結果と一致している(5)。初期混合リンパ球反応(mixed-lymphocyte reaction:HLR)に於いて刺激細胞集団に紫外線(UV)照射すると増殖反応が殆んど又は全く見られなくなることから、免疫に使用する前にI a 担持細胞を除去する必要はなく、しかしながらUV光で不活性化することが必要であり得、これによって刺激同種シグナル(stimulating allogeneic signal)を遊離(abrogation)し、また一方主要組織適合複合抗原をそのまま残すことで提供体固有の免疫非応答を誘導するという仮説を立てた。

ACI株ラット(RT²)に60mg/kgの割合でストレプトゾトシンを静脈注射し糖尿病状態にした。その血中グルコース濃度が300mg/dlを3週間より長い期間に亘って越えた時にのみ血液及び島の受容体として用いた。血漿グルコースの測定値が2日連続して200mg/dlより大きかった場合には、島移植片は拒絶されたものと考えた。

ノーマル・ルイス・ラット(RT²)から心臓穿刺によって全血液を採取した。その血液を生理的リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline:PBS)で1:50に希釈し、250mlのベトリディッシュに磁気攪拌子と併に入れ、それをディッシュから10cm離れた距離の2つのシルバニア(Sylvania FS-20)ランプで20分間照射した。その後血液細胞を遠心分離し、その結果得られたペレットを、詰った状態での細胞の容積が50%になるようにPBS中で再懸濁した。糖尿病に患った各ACIラットに1mlのUV照射血液か、又は同様に処理して照射はされていない1mlの血液を、上述のように50%の詰った細胞容積に調節して、島移植の3週間、2週間及び1週間前に陰茎静脈経由で静注した。糖尿病に患ったACIラットの1つのグループ

は予輸血処理なしで島を受容した。

ルイス(RT²)及びウィスター・ファース(Wistar Furth:WF(RT⁴))ラットからコラゲナーゼ法(7)及びフィコール(Ficoll)勾配分離法(8)、続いて解剖顕微鏡下のハンドピッキング(hand picking)によって脾臓の島を摘取した。約1200~1500の新たに用意された同種の島を糖尿病に患ったACIラットの4つのグループに門脈内(intraportally)で移植した。島受容の2つのグループ(グループ1及び4)は最初にUV-照射全血液を輸血した。1つの対照グループ(グループ3)は島の受容前に輸血は受けず、一方2番目の対照グループ(グループ2)は同種移植前に未照射の全血を輸血された。

全血液に対するのと全く同様な方法で照射されたものか又は未照射のルイス・ラットの末梢血リンパ球を使った生体外

(イン・ヴィトロ)研究を上述の研究と伴に行なった(9)。

¹²⁵Iで標識されたスタフィロコッカス・プロテインA(staphylococcal Protein A)を用いて、UV照射されたか又は照射処理されていない末梢血から得たルイス・ラットのリンパ球上の、ラットI a (HRC-0X4)に対するモノクローナル抗体(10)

及びポリクローナルなラビット抗ラットリンパ球血清 (エム・エイ・バイオプロダクツ (M.A. Bioproducts)) の結合を測定した (11)。照射されたか又は未照射の全血液 (島同種移植前の輸血の際に記載されたときと同一の処理) から得られたルイスリンパ球を刺激細胞として、及び胸管リンパ球を応答細胞として用いてMLRを行なった (12)。

未照射の全血液から得たルイスリンパ球と比較して、UV照射された血液から得たルイス末梢血リンパ球はACI胸管リンパ球を顕著には刺激しなかった (表1)。

表1 MLRに於けるルイスラット末梢血リンパ球 (PBL)

の刺激活性に及ぼすUV照射の影響。

数値は平均値±標準偏差である。

応答体	刺激体	[3H]チミジン 取り込み (カウント/分)
ACI	ACI	465±153
ACI	ルイスPBL	5371±543
ACI	ルイスPBL及び 20分間のUV照射	722±102

UV照射されているがいまいが、ラットリンパ球に対するラビット抗血清とラットIa (MRC/OX4) に対するモノクローナル抗体は、ルイス末梢血リンパ球に対して類似の結合を示した。従って、ラジオイムノアッセイによって鮮かに示されたように主要組織適合抗原はリンパ球への予照射によっても量的に変化しないにもかかわらず、MLRに於いて照射された末梢血リンパ球による同種刺激 (allostimulation) は観察されなかった。

イン・ヴィヴオな同種移植実験に於いて、UV照射されたルイス全血液を輸血されその後新鮮なルイス島を移植された糖尿病ACI受容体 (グループ1) は100%の正常血糖への転換を示した。同種移植後160日より長い期間に亘って、10匹のうちのどの1匹にも組織拒絶は見られなかった。未輸血の対照グループ (グループ3) と未照射の血液を輸血された対照グループ (グループ2) は似たような平均生存期間を示した (それぞれ8.2±2.9及び8.8±4.1日)。照射ルイス全血液を事前に輸血された糖尿病ACI受容体に第三者の島を移植すると (グループ4)、その島の拒絶と糖尿病状態への回復が通常の形で起った (平均生存期間、7.5±3.0日、表3及び第1図)。

ラジオイムノアッセイでは、照射ルイス末梢血から得られたリンパ球と未照射の血液から得られたリンパ球との間に顕著な差は見られなかった (表2)。

表2 ルイスラットPBL表面抗原の血清学的反応性

(serological reactivity)に及ぼすUV光の影響。数値はアッセイ毎に結合した¹²⁵I-標識されたスタフィロコッカス・プロテインAの平均カウント (±標準偏差) である (バックグラウンド、200カウント/分)。

抗 原	PBL	PBL及びUV照射 (20分)
ラットリンパ球に対するラビット抗血清	2996±172	3315±434
ラットIa (MRC/OX4) に対するモノクローナル抗体	2050±421	1963±268

表3 様々な処理グループと対照グループに於ける移植島の生存

グループ	処 理	提供種	個体数	生 存 期 間 (日数)	平均生存期間 ±標準偏差 (日数)
1	照射ルイス血液	ルイス	10	>160	
2	ルイス血液	ルイス	5	3, 7, 9, 11, 14	8.8±4.1
3	な し	ルイス	5	5, 7, 8, 8, 13	8.2±2.9
4	グループ1と同じ	WF	4	6, 6, 6, 12	7.5±3.0

これらの結果は、提供体の型の全血液をUV照射してそれを輸血することによって移植島の生存がおそらくは無期限に延長し、糖尿病主体が正常血糖に戻ることを示している。これらの結果は免疫抑制薬を一斉用いず得られたもので、UV照射血液による非応答の誘導は提供体に固有のものと思われる。平行して行なわれたイン・ヴィトロの研究は、血液をUV照射することでMLRに於ける血液リンパ球の刺激効果を阻害した (とえUVを吸収する赤血球細胞が存在していても)、一方Ia (ラジオイムノアッセイで示されたように) 又はラビット抗ラ

ットリンパ球血清によって測定され得る抗原の血清学活性には何らの影響も及ぼさないことを示唆している。これらの発見は、同種刺激は代謝的に活性なIa担持細胞の存在を必要とし、不活性化した細胞による免疫感作でラットに於ける同種移植島への種特異的な免疫非応答を引き続いて誘起することができるということを示唆している。同種移植に対する免疫非応答やTサブレッサー細胞の誘導については様々な輸血プロトコールによって示されてきたが、結果は一定せず一般的には免疫抑制を必要とした(13)。ファウストマン (Faustman) 等が指摘するように(4)、島移植に於いては、“汚染 (contaminating)” Ia担持細胞によって刺激とそれに続く拒絶が起こるが、しかしながら我々の発見は、これらの細胞を物理的に除去する必要はなく単に不活性化することで、免疫抑制を追加介在させなくても主体に免疫非応答を引き起こし得るということを示唆している。組み換えマウス種 (recombinant mouse strains) を用いた研究(14)は、UV照射によってIクラス抗原の顕著な変化なしにIa-シグナルが変わるという結論を支持している。これらは多分該細胞の代謝的不活性化によって起こるのであろう。

このように、UV照射によって提供体固有の免疫非応答を誘

導する有望な方法が得られる。UV照射によって血液生産物を免疫不活性化することは、Iaに対する特異抗体が使えないか又は要求されないような他の種に於ける同種移植に容易に適用され得るであろう。この方法は提供体固有の輸血がすでになされた地域 (area) で、ヒトの器官移植に於いても有用であり得、提供体の主要組織適合抗原に対する刺激の可能性を消失し得る。延長 (又は無期限に延長) された同種移植島の生存と糖尿病の治療が、糖尿病主体の免疫抑制を必要とせずこの簡便で巧妙な手段によって達成され得る。

B. UV照射器官及び組織

主要組織適合複合体 (MHC) の不一致は移植組織の拒絶を引き起こすが、主体によるこの不適合性の認識が拒絶プロセスを開始する上の決定的な因子に思われる。主体による異物 (foreignness) の認識は移植片上のクラスI及びクラスII MHC抗原の両者の存在を必要とするように思われ、この2つのクラスの抗原をもつリンパ-網状細胞 (lymph-reticular cells) が主体を刺激し初期免疫応答を起こさせるものと考えられている (15-17)。我々はここで、ラット樹枝状刺激細胞への照射後にMLC応答を阻害させることができる (18-21) だ

けの適当な照射量で、内分泌機能を変えことなく膵臓島の免疫原性 (immunogenicity) を弱め、免疫抑制剤を使用することなく糖尿病主体に於けるラット島同種移植島の生存を延長することができるというデータを示す。

移植拒絶を引き起こすと考えられてきた“伝達白血球 (passenger leukocyte)”の正確な性質は明白になっていない。ラットの樹枝状細胞 (dendritic cells) はT細胞増殖の際の及^{1) 11000}び伝達白血球欠損ラット腎臓の素早い拒絶を引き起こす際の補助細胞 (accessory cells) として非常に強力であると言われてきている (22)。我々は初めて、求心性リンパ (afferent lymph) から由来したラットの樹枝状細胞にUV照射すると、MLCに於いてそれらの細胞の刺激活性を弱めることができるということを調べた。ACI (RT ℓ^a) ラット胸管リンパ球 (TDL) を応答細胞として、ルイス (RT ℓ^k) ラット樹枝状細胞 (DC) を刺激細胞として用いて、 10^5 DCについて400より大きい高刺激指数 (SI) を得た (第2図)。DC刺激細胞数が、 125×10^5 に減少すると残留SIは著しく上がった (162)。UV照射された (シルバニアFS-20で800 J/cm² から1000 J/cm² まで露光) 樹枝状細胞は、MLCに於ける刺激細胞とし

て全く影響を及ぼさず、その結果SIは3であった。MLCに於いて (20, 23) 及び移植拒絶を引き起こすこと (21) に於いて示されるように、樹枝状細胞は非常に強力な同種刺激細胞であるが、それらはガンマ照射ではなく紫外線 (UV) 照射によって不活性化されるようである。

いったんMLC応答を弱めるのに必要なUV照射量範囲を決めてしまってから、UV照射された島 (同照射量範囲) がストレプトソチン (STZ) 誘導の同系 (Syngeneic) 糖尿病ラットの糖尿病状態を変換させることができるかどうかを調べた (第3図)。1000 J/cm² で照射されたルイス・ラット島を門脈内で糖尿病ルイス受容体に移植すると、その糖尿病動物を5日間より少ない間正常血糖状態に戻すことができた。1100又は1200 J/cm² で照射した島では戻すことができなかった。600又は900 J/cm² で照射したものは全ての糖尿病同系受容体に於いて正常血糖に無期限に戻すことができた。このように、 10^5 DCを刺激細胞として用いたMLCに於いて増殖応答を阻害させることのできるUV照射量は、900 J/cm² で照射された同系島移植片のようにイン・ヴィボに於ける内分泌機能に有害な影響を及ぼさない。

同種の島の免疫原性がこのような照射後に減少したのかについて結論を下すために、ルイス(RT¹)島をSTZ誘導糖尿病ACIラットに移植した(第4図、第4表)。

表4 糖尿病ACI受容体に於けるルイス島同種移植片の生存に対する直接UV照射効果

島処理	個体数	生存期間(日数)	平均生存期間 ±標準偏差
24時間培養	10	4, 4, 4, 6, 6, 7, 7, 8, 9, 13	6.8 ± 2.7日
UV及び24時間培養	11	10, 10, 18, 75, 75, 75, 75, 110, 110, 110, 110	> 80日

24時間37℃で培養したルイス島を移植された全ての対照ACI動物はその移植片を拒絶し、6.8±2.7日後に再び糖尿病状態になった。ルイス島を900J/cm²でUV照射し、24時間培養してから糖尿病ACI受容体に移植した場合は、11の移植動物中8に於いて70日より長い期間(4>110日)島の生存が延長し、その8の全てについてはまだ正常血糖にある。この結果は、同種移植に先立って同種ラットの島をその内分泌機能に害を与えないような量でUV照射すれば、免疫抑制なしでそ

の島の免疫原性を減少させ同種移植片の生存を延長させることができるということを表わしている。

同種移植拒絶を開始する上での伝達白血球の重要性は移植免疫学に於いて繰り返されてきたテーマであった(24-27)。長期培養することによって選択的にリンパ網状要素の島を枯渇させることができる(30)という仮定に全て基づいて、島の移植に於いて、様々な生体外(イン・ヴィトロ)培養技術(28, 29)が同種移植の生存を延長するために用いられてきた。ごく最近、抗クラスII MHC抗原血清及び補体を用いてIa担持細胞を除去し、マウスに於いて同種の島移植片の生存を延長することができた(31)。関与している伝達白血球の正確な性質についてはまだ確かではない。この疑問に対して、MLCに於けるT細胞の初期同種活性化に対する細胞間樹状細胞の役割とラットの腎臓同種移植の拒絶に対するそれらの役割に関する研究によってその解決が試みられた(20, 22, 32)。ラットの島、腎臓及び心臓にこのようなクラスII MHC抗原担持細胞が過在することは、これらの細胞が一般に考えられている“伝達白血球”であり、それが主体の同種移植抗原に対する直接の刺激の原因になっているのかも知れないということを示唆する(21, 33)。

本研究に於いては、初期のMLCに於いて樹状細胞が、関係するT応答細胞に対する非常に強力な活性化体であり、それらの刺激活性を適当なUV照射によって完全に不活性化できることを示した。

以前の数々の研究により、UV照射が抗原提供細胞(antigen presenting cells, APC)に対して選択的に影響を及ぼし(34-36)、UV照射APCの受動輸送によって抗原特異的Tサブレッサー細胞が誘導されること(37)が示されてきた。従ってこれらと他の研究(38-40)によって不適当な抗原提供、すなわち刺激白血球がない同種移植によって、主体のAPCによって抗原が主体のT細胞に再び提供され、それによって提供体固有Tサブレッサー細胞の生産が起り得るまで異物の非認識を奏効し得るか、又はTサブレッサー細胞の優先的な生産が誘導され得ることが示唆される。我々は以前に末梢血リンパ球にUV照射をしてもクラスII MHC抗原を含む細胞表面抗原に量的な変化を与えないことを示した(41)。初期同種刺激はクラスI及びクラスII抗原担持リンパ網状細胞を必要とするだけでなく(31, 42)、それら細胞は代謝的に活性でなくてはならず、又それらはUV照射によって不活性化されるように思われる

(43)。

照射された島の生存が延長することは、それらにMLC応答を阻害させるに有効なUVを照射することで島調製物中に存在する細胞間樹状細胞又は他の同種刺激細胞を弱めるのに選択的効果があることを示唆している。島は単一細胞の懸濁液ではないので、幾らかの同種刺激白血球は完全な不活性化からのがれて、それが島同種移植の生存延長に於ける27%の誤差率の原因になっているのかも知れない。UV照射伝達及び島の機能且つ同時に島調製物に含まれる樹状細胞や他のリンパ網状細胞の同種刺激活性に対するUV照射の最終的効果の説明により正確な定型の方法はこの方法が常に成功するために必要である。

結論として、島を短時間UV照射することで内分泌機能を損うことなくそれらの免疫原性を弱め、どんな免疫抑制剤をも使用することなく糖尿病主体に於ける島同種移植片の生存と機能を長期間維持することができることを示した。この方法は長期培養技術に較べて顕著な有位性を与え、抗-クラスII MHC抗原特異血清を使用する必要がない。本研究が他の動物、究極的にはヒトの島移植に対する基礎を形成するものであると我々は信ずるものである。

参照及び注解

- (1) デー・ファウストマン (D. Faustman), ヴィ・ハウプトフィールド (V. Hauptfeld), ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy), ジェー・エム・ディヴィー (J. M. Davie), プロス・ナトゥル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.), 米国 (U. S. A) 第78巻, 第5156頁 (1981); エヌ・エー・ステインズ (N. A. Staines), ケイ・ガイ (K. Guy), デー・エー・エル・ディヴィーズ (D. A. L. Davies), ユール・ジェー・イムノル (Eur. J. Immunol.) 第5巻, 第782頁 (1975)
- (2) エー・ラビノヴィッチ (A. Rabinovitch), アール・アレジャンドロ (R. Alejandro), ジェー・ノエル (J. Noel), ジェー・ビー・ブランシュウィック (J. P. Brunschwig), ユ・エス・ライアン (U. S. Ryan), 糖尿病 (Diabetes) 第31巻 (増補 (Suppl.) 第4巻), 第48頁 (1982); デー・エヌ・ジェー・ハート (D. N. J. Hart) 及び ジュー・ダブルユー・ファープル (J. W. Fabre), ジェ・エクス・メド (J. Exp. Med.) 第153巻, 第347頁 (1981); エス・ヴィー・フュグル (S. V. Fuggle) 他, ト

(6) ビー・ヘイリー (P. Hayry) 及び エル・シー・アンダーソン (L. C. Andersson), スカンド・ジェー・イムノル (Scand. J. Immunol.) 第5巻, 第391頁 (1976); ケー・リンダーラー・カイスリング (K. Lindahl-Kiessling) 及び ジェー・サフエンバーグ (J. Safwenberg), イント・アーキ・アレルギー・アブル・イムノル (Int. Arch. Allergy-⁵Appl. Immunol.) 第441巻, 第670頁 (1971).

(7) ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy) 及び エム・コスチャノフスキー (M. Kostianovsky), 糖尿病 (Diabetes) 第16巻, 第35頁 (1967).

(8) エー・エム・リンドール (A. M. Lindall), エム・ステフェス (M. Steffess), アール・ソレンソン (R. Sorenson), エンドクリノロジー (Endocrinology) 第85巻, 第218頁 (1969).

(9) エー・ボイヤム (A. Boyum), スカンド・ジェー・クリン・ラブ・インベスト (Scand. J. Clin. Lab. Invest.) 第21巻 (増補 (Suppl.) 第97巻), 第77頁, (1968).

(10) ダブルユー・アール・マックマスター (W. R. McMaster) 及び エー・エフ・ウィリアムス (A. F. Williams),

ランスプランテーション (Transplantation) 第35巻, 第385頁 (1983).

(3) ケー・アイ・ウェルシュ (K. I. Welsh), エイチ・バゴス (H. Burgos), ジェー・アール・バッチェラー (J. R. Batchelor), ユール・ジェー・イムノル (Eur. J. Immunol.) 第7巻, 第267頁 (1977); ビー・ビー・メダワー (P. B. Medawar), 移植の生物学的問題点 (Biological Problems of Grafting) 中, エフ・アルバート (F. Albert) 及び ジー・ルジェヌ・レダント (G. Lejeune-Ledant), 編, ブラックウェル (Blackwell), オックスフォード (Oxford, 1959), 第8頁.

(4) デー・ファウストマン (D. Faustman), ビー・レイシー (P. Lacy), ジェー・ディヴィー (J. Davie), ヴィ・ハウプトフィールド (V. Hauptfeld), サイエンス (Science) 第217巻, 第157頁 (1982).

(5) オー・サルバティエラ (O. Salvatierra), エフ・ヴィンセンティ (F. Vincenti), ダブルユー・アメンド (W. Amend), アン・サージ (Ann. Surg.) 第192巻, 第543頁 (1980).

ユール・ジェー・イムノル (Eur. J. Immunol.) 第9巻, 第426頁 (1979).

(11) ジェー・ビー・ブラウン (J. P. Brown), ジェー・ディー・ジャメリウス (J. D. Jamerius), アイ・ヘルストロム (I. Hellstrom), ジェー・イムノル・メソッド (J. Immunol. Methods) 第31巻, 第201頁 (1979); ジー・エス・アイゼンバーズ (G. S. Eisenbarth), ビー・エフ・ヘインズ (B. F. Haynes), ジェー・エー・シュロアー (J. A. Schroer), エー・エス・フォーシ (A. S. Fauci), ジェー・イムノル (J. Immunol.) 第124巻, 第1237頁 (1980).

(12) MLRは、10%ラット血清、L-グルタミン、ペニシリン (100 μ g/ml) 及びストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加したRPMI 1640培地で94穴U底マイクロタイタープレート (ファルコンプラスチック (Falcon Plastics)) 中で行なった。ACIラットの胸腔リンパ球を応答体として、紫外線照射又は未照射の血液から分離した (フィコール・ハイパーク沈降により精製) 末梢血リンパ球を 5×10^5 細胞数/穴の濃度で刺激体として用いた。

チミジンに16時間暴露するのを含めた96時間後にプレートを

ハーベストした。

- (13) ビー・テラサキ (P. Terasaki), 移植プロス (Transplant. Proc.) 第14巻, 第1頁 (1982); ジェー・ダブルユー・ファブール (J. W. Fabre) 及びビー・ジェー・モリス (P. J. Morris), 移植 (Transplantation) 第14巻, 第608頁 (1972); エイチ・オカザキ (H. Okazaki), ティー・マキ (T. Maki), エム・エル・ウッド (M. L. Wood), 同書, 第129巻, 第341頁 (1980); エル・ブレント (L. Brent), ティー・ホースバーク (T. Horsburgh), ビー・ジェー・ウッド (P. J. Wood), 移植プロス (Transplant. Proc.) 第12巻, 第464頁 (1980).
- (14) エフ・エイチ・バック (F. H. Bach) 他, イムノル・レヴ (Immunol. Rev.), 第35巻, 第76頁 (1977); ビー・ジェー・アルター (B. J. Alter), ティー・ジェー・シェンデル (D. J. Schendel), エフ・エイチ・バック (F. H. Bach), ジェー・エクス・メド (J. Exp. Med.), 第137巻, 第1303頁 (1973).
- (15) デー・ダブルユー・タルマーシ (D. W. Talmage), ジー・ダート (G. Dart), ジェー・ラドヴィッチ (J.

- Radovich), ケー・ジェー・ラファティ (K. J. Lafferty), サイエンス (Science) 第191巻, 第385頁 (1976).
- (16) ケー・ジェー・ラファティ (K. J. Lafferty), ジェー・ウールナフ (J. Woolnough), イムノロジャール・レヴ (Immunological Rev.) 第53巻, 第231頁 (1977).
- (17) ジー・スネル (G. Snell), アン・レヴ・マイクロバイオル (Ann. Rev. Microbiol.) 第2巻, 第439頁 (1957).
- (18) ビー・ヘイリー (P. Hayry), エル・シー・アンダーソン (L. C. Andersson), スカンド・ジャーナル・イムノル (Scand. J. Immunol.) 第5巻, 第391頁 (1976).
- (19) ケー・リンダーラー・カイスリング (K. Lindahl-Kiessling), ジェー・サフエンバーク (J. Safwenberg), イント・アーク・アレルギー (Int. Arch. Allergy) 第41巻, 第670頁 (1971).
- (20) デー・ダブルユー・メイソン (D. W. Mason), シー・ダブルユー・バフ (C. W. Pugh), エム・ウェブ (M. Webb), イムノロジー (Immunology) 第44巻, 第75頁 (1981).
- (21) ダブルユー・イー・エフ・クリンラート (W. E. F. Klinfert), ジェー・エイチ・ラバディー (J. H. La

- Badie), ダブルユー・イー・ボワーズ (W. E. Bowers), ジェー・エクス・メド (J. Exp. Med.), 第156巻, 第1頁 (1982).
- (22) アール・アイ・レシュラー (R. I. Lechler), ジェー・アール・バッチェラー (J. R. Batchelor), ジェー・エクス・メド (J. Exp. Med.) 第155巻, 第34頁 (1982).
- (23) アール・エム・スタインマン (R. M. Steinman), エム・デー・ウィットマー (M. D. Witmer), プロス・ナトル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.) 米国 (USA) 第75巻, 第5132頁 (1978).
- (24) ケー・ジェー・ラファティ (K. J. Lafferty), エス・ジェー・プロウス (S. J. Prowse), エム・アゴスティーノ (M. Agostino), シー・ジェー・シメノヴィック (C. J. Simenovic), 移植プロス (Transplant Proc.) 第15巻, 第1366頁 (1983).
- (25) エス・ジェー・プロウス (S. J. Prowse), ケー・ジェー・ラファティ (K. J. Lafferty), シー・ジェー・シメノヴィック (C. J. Simenovic), エム・アゴスティーノ (M. Agostino), ケー・エム・ボーウェン (K. M.

- Bowen), イー・ジェー・スティール (E. J. Steele), 糖尿病 (Diabetes), 第31巻, 第30頁 (1982).
- (26) アール・イー・ビルingham (R. E. Billingham), セル・イムノル (Cell. Immunol.), 第2巻, 第1頁 (1971).
- (27) ダブルユー・ケー・シルバース (W. K. Silvers), エイチ・エル・フレミング (H. L. Fleming), エー・ナジ (A. Naji), シー・エフ・バーカー (C. F. Barker), 糖尿病 (Diabetes) 第31巻, 第60頁 (1982).
- (28) ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy), ジー・エム・ディヴィー (J. M. Davie), イー・エイチ・フィンケ (E. H. Finke), サイエンス (Science), 第204巻, 第312頁 (1979).
- (29) エム・ケディンガー (M. Kedinger), ケー・ハフェン (K. Haffen), アール・グレンニエ (R. Grenier), アール・エロイ (R. Eloy), ネイチャー (Nature) 第270巻, 第736頁 (1977).
- (30) エー・ラビノヴィッチ (A. Rabinovitch), アール・アレジャンドロ (R. Alejandro), ジェー・ノエル (J. Noel), ジェー・ビー・ブランシュウィグ (J. P. Brun-

schweig), ユー・エス・ライアン (U. S. Ryan), 糖尿病 (Diabetes), 第31巻, 第48頁 (1982).

(31) ディー・ファウストマン (D. Faustman), ヴィー・ハウプトフェルト (V. Hauptfeld), ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy), ジェー・ディヴィー (J. Davie), プロス・ナトル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.), 米国 (USA) 第78巻, 第5156頁 (1981).

(32) アール・エム・スタインマン (R. M. Steinman), ビー・グチノフ (B. Gutchinov), エム・ウィトマー (M. Witmer), エム・シー・ヌッセンズウェイグ (M. C. Nussensweig), ジェー・エクス・メド (J. Exp. Med.), 第157巻, 第613頁 (1983).

(33) デー・エヌ・ジェーハート (D. N. J. Hart), ジェー・ダブルユー・ファープル (J. W. Fabre), ジェー・エクス・メド (J. Exp. Med.), 第153巻, 第347頁 (1981).

(34) エル・ジェー・フォックス (L. J. Fox), エル・エル・ペリー (L. L. Perry), エス・マン・サン (S. Man Sun), ビー・ベナセナフ (B. Benacnaf), エム・アイ・グ

リーン (M. I. Greene), クリーン・イムノル・アンド・イムノバス (Clin. Immunol. & Immunopath.) 第17巻, 第141頁 (1980).

(35) エヌ・エル・レトヴィン (N. L. Letvin), エム・アイ・グリーン (M. I. Greene), ビー・ベナセナフ (B. Benacnaf), アール・エヌ・ジャーマン (R. N. Germain), プロス・ナトル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.), 米国 (USA) 第77巻, 第3882頁 (1980).

(36) アイ・ジェー・フォックス (I. J. Fox), エス・マン・ファン (S. Man Fun), ビー・ベナセナフ (B. Benacnaf), エム・アイ・グリーン (M. I. Greene), 移植 (Transplantation) 第31巻, 第262頁 (1981).

(37) エム・アイ・グリーン (M. I. Greene), エス・マン・サン (S. Man Sun), エム・クリプケ (M. Kripke), ビー・ベナセナフ (B. Benacnaf), プロス・ナトル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.), 米国 (USA) 第76巻, 第6591頁 (1979).

(38) アイ・エム・ジトロン (I. M. Zitron), ジェー・オノ (J. Ono), ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy), ジ

ー・エム・ディヴィー (J. M. Davie), 移植 (Transplantation) 第32巻, 第156頁 (1981).

(39) シー・ジー・ジャーニー (C. G. Janney), ジェー・エム・ディヴィー (J. M. Davie), ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy), イー・エイチ・フィンケ (E. H. Finke), 移植 (Transplantation) 第33巻, 第585頁 (1982).

(40) ケー・アイ・ウェルシュ (K. I. Welsh), エイチ・バークス (H. Burgos), ジェー・アール・バッチェラー (J. R. Batchelor), ユール・ジェー・イムノル (Eur. J. Immunol.), 第7巻, 第267頁 (1977).

(41) エイチ・ティ・ロー (H. T. Lau), ケー・リームツマ (K. Reemtsma), エム・イー・ハーディ (M. A. Hardy), サイエンス (Science), 第221巻, 第754頁 (1983).

(42) デー・ディヴィーズ (D. Davies), エヌ・スタインズ (N. Staines), 移植レブ (Transplant Rev.), 第30巻, 第18頁 (1976).

(43) デー・ダブルユー・タルマー (D. W. Talmage), ジェー・イー・ウールナフ (J. A. Woolnough), エイチ・ヘミングソン (H. Hemmingson), エル・ロベス (L. Lopez),

ケー・ジェー・ラファティ (K. J. Lafferty), プロス・ナトル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.), 米国 (USA) 第75巻, 第4610頁 (1977).

(44) アール・エム・スタインマン (R. M. Steinman), ゼット・エー・コーン (Z. A. Cohn), ジェー・エクス・メド (J. Exp. Med.), 第139巻, 第380頁 (1974).

(45) アール・エム・スタインマン (R. M. Steinman), エム・エル・ヌッセンズウェイグ (M. L. Nussensweig), イムノロジカル レヴ (Immunological Rev.), 第55巻, 第127頁 (1980).

(46) ビー・イー・レイシー (P. E. Lacy), エム・イー・コスタノフスキ (M. A. Kostianovsky), 糖尿病 (Diabetes), 第16巻, 第35頁 (1972).

(47) エー・リンドール (A. Lindall), エム・ステフェス (M. Steffes), アール・ソレンソン (R. Sorenson), エンドクリノロジー (Endocrinology), 第84巻, 第213頁 (1969).

浄菌(内容に変更なし)

FIG. 1

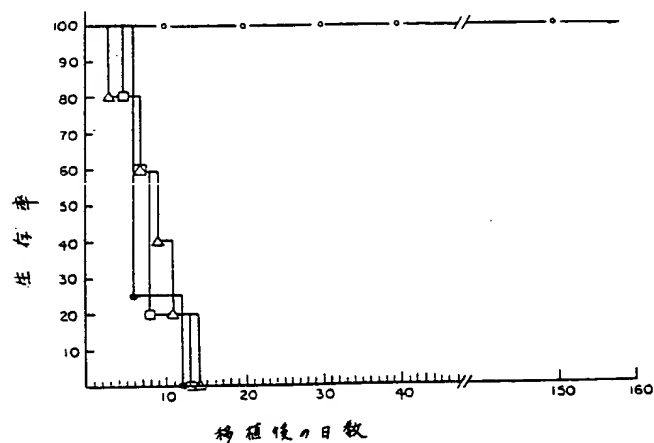


FIG. 2

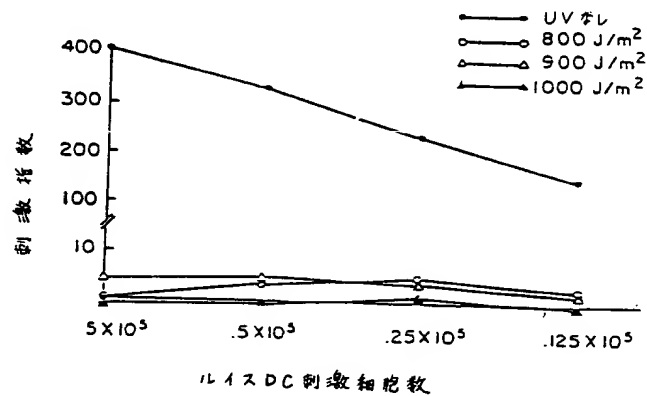


FIG. 3

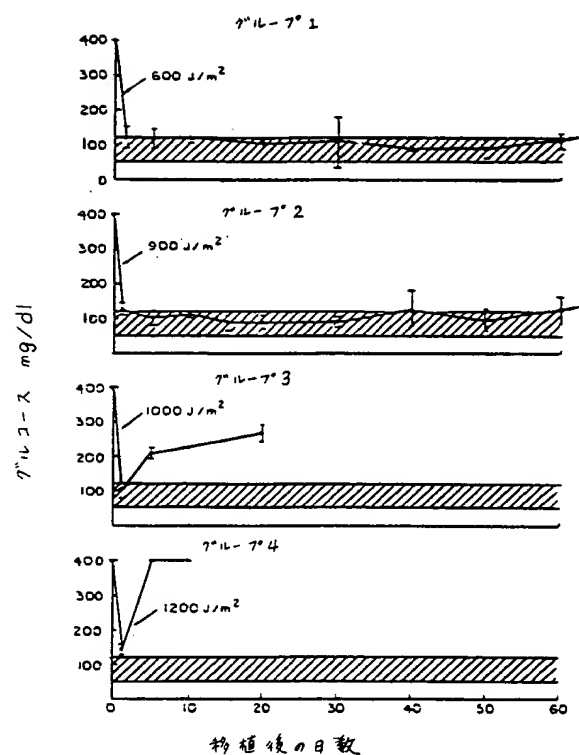
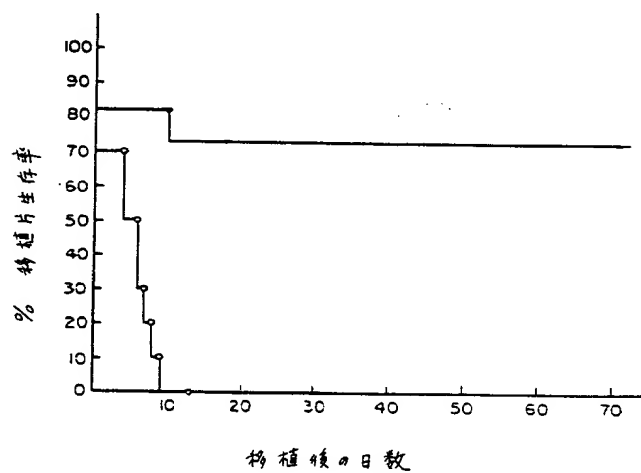


FIG. 4



昭和60年8月15日

特許庁長官 宇賀道郎殿

1. 事件の表示 PCT/US 84/01347
2. 発明の名称 移植器官及び組織の受容性を高める方法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
- 名称 ザ・トラステイズ・オブ・コロンビア・
ユニヴァーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・
・ニューヨーク
4. 代理人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 354-8623
(6200) 弁護士 川口 義 雄
5. 補正命令の日付 自 発
6. 補正により増加する発明の数
7. 補正の対象 図面の翻訳文
8. 補正の内容
(1) 鮮明な図面の翻訳文を別紙の通り補充する。
(内容に変更なし)

特許庁
60.8.16
国際出願書

International Application No. PCT/US84/01347

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (In terms of classification symbols used, please see:)

Int. Cl. 9 A61K 1/02; C12N 13/00; A61M 37/00; A61N 1/30; A61K 35/12;
U.S. 435/1,2,173,283; 604/4,20,49,52,905; 129/395; 424/95,101,204/1585,157,15

2. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched:

Classification System	Classification Symbols
U. S.	435/1,2,173,283 604/4,20,49,52,905 424/95,101
	129/395 204/1585, 157,15

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the extent that such Documents are included in the Fields Searched:

Lexpat Search
Computer Search of Chemical Abstracts, Biosis, Previews & Medline Databases

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT:

Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. 1
X	US,A, 1,883,877, published 11 September 1928; Edsion et al.	8,9
X	US,A, 3,973,001, published 03 August 1976; Jaeger et al., see col. 1, lines 14-21	8,9
X	SU,A, 342630, published 18 July 1972	8,9
Y,P	US,A, 4,456,589, published 26 June 1984; Holman et al., see col. 2, lines 6-15	11-21
X	N, Anatomy and Physiology, published 1961, Kimber et al., The MacMillan Company, New York, pages 306-315, 430-431	17-19
Y	US,A, 1,883,877, published 11 September 1928; Edsion et al.	1-7, 10-21

* Special categories of cited documents: 11

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other related claim (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is compared with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document number of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search: 19 November 1984

Date of Mailing of this International Search Report: 26 NOV 1984

International Searching Authority: ISA/US

Signature of Authorized Officer: Randolph E. Dack

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (October 1981)

International Application No. PCT/US84/01347

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y	US,A, 3,973,001, published 03 August 1976; Jaeger et al., see col. 1, lines 14-21	1-7, 10
Y	SU,A, 342630, published 18 July 1972	1-7, 10
A	US,A, 4,321,918, published 30 March 1982; Clark II	1-21
X	US,A, 4,321,919, published 30 March 1982; Edelson	8,9
Y	US,A, 4,321,919, published 30 March 1982; Edelson	1-7, 10

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE 11

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

☐ Claim numbers because they relate to subject matter 11 not required to be searched by this Authority, namely:

☐ Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out 11, specifically:

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING 11

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claim(s):

☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim number(s):

☐ As all searchable claims could be searched without effort (involving an additional fee), the international Searching Authority did not invent payment of any additional fee.

Remarks on Protest:

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (supplemental sheet) (2) (October 1981)

International Application No. PCT/US84/01347

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. 1
X	DT,A, 3,109,691, published 23 September 1982	8,9
Y	DT,A, 3,109,691, published 23 September 1982	1-7, 10
A,Z	US,A, 4,471,629, published 18 September 1984; Toledo-Pereyra	10-21
X	DT,A, 2803446, published 02 August 1979	17,19

Form PCT/ISA/210 (third sheet) (October 1981)

第1頁の続き

⑦発明者 ハーデイ, マーク・エイ

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10583、スカーズデイル、リッ
ジ・クレスト・イースト・7

⑦発明者 ロウ, ヘンリー・ティン

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10031、ニュー・ヨーク、ウエ
スト・ワンハンドレッド・アンド・エイズ・ストリート・201